

Вплив іонів літію на стероїдогенез і рівень експресії протеїнкінази ERK у тканині кори надниркових залоз

Н.І. Левчук,
О.С. Лукашеня,
О.І. Ковзун,
О.С. Микоша

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Відомо, що препарати літію використовують у лікуванні психічних розладів. Натомість ефекти іона, пов'язані з процесами синтезу стероїдних гормонів у корі надниркових залоз, вивчено недостатньо. **Мета.** Дослідити вплив різних концентрацій літію хлориду *in vitro* на вміст 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) і рівень експресії тотальних форм ERK1/2 у тканині надниркових залоз. **Матеріали та методи.** У досліджах *in vitro* використано поопераційну адренкортикальну тканину та тканину надниркових залоз морських свинок. Кількісне визначення рівня 11-ОКС проводили флуориметричним мікрометодом. Рівень експресії ERK1/2 вивчали за допомогою вестерн-блот-аналізу. **Результати.** Інкубація зрізів позапухлинної тканини надниркових залоз людини з літію хлоридом приводить до підвищення рівня 11-ОКС у живильному середовищі та рівня експресії ERK1/2 у тканині надниркових залоз морських свинок. **Висновок.** Стимуляція синтезу кортикостероїдів за умов дії літію хлориду в адренкортикальній тканині *in vitro* може бути опосередкованою ERK1/2.

Ключові слова: літію хлорид, 11-ОКС, ERK1/2, тканина кори надниркових залоз.

До регуляції проліферації клітин і функції надниркових залоз залучено значну кількість чинників найрізноманітнішої природи, які реалізують свої ефекти через складні мережі месенджерних каскадів. Серед них важливе місце посідають системи цАМФ-залежної протеїнкінази А та протеїнкінази С [1]. Участь протеїнкіназ, що активуються мітогенами (МАРК), зокрема ERK (від англ. extracellular signal regulated kinase), в регуляції

синтезу кортикостероїдних гормонів залишається майже не дослідженою.

Відомо, що солі літію використовують як терапевтичний засіб у психіатрії для лікування маніакально-депресивних станів, а також в ендокринології для лікування захворювань, пов'язаних із підвищеною функцією щитоподібної залози [2, 3]. Нашу увагу іони літію привернули своєю здатністю впливати на синтез кортикостерону та альдостерону в тканині кори надниркових залоз [4-6]. Проте механізми впливу літію на функцію залози залишаються далекими від цілкового розуміння.

* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: zdovado@ukr.net

© Н.І. Левчук, О.С. Лукашеня, О.І. Ковзун, О.С. Микоша

Дія літію в різних типах клітин опосередковується низкою систем внутрішньоклітинної сигналізації. Показано, що літій знижує активність аденілатциклази [7], рівень цАМФ у корі мозку [8], змінює вміст цАМФ-чутливого білка CREB [9], утворення цАМФ в активованих тиреотропним гормоном тиреоцитах [10]. Крім того, іони літію спричиняли двократне підвищення вмісту цГМФ у мозку [11]. Літій регулює через ПКС-залежні механізми активність мітоген-активованої протеїнкінази JNK у мозку [8]. Є дані про вплив іонів літію на активність кінази глікогенсинтази-3 β (GSK-3 β) [12].

З огляду на вищевикладене метою роботи було дослідження впливу літію хлориду *in vitro* на секрецію 11-ОКС і рівень експресії ERK1/2 у тканині кори надниркових залоз.

Матеріали та методи

Експерименти *in vitro* виконано на тканині надниркових залоз морських свинок і поопераційній тканині надниркових залоз хворих, прооперованих у хірургічному відділенні ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Для досліджень відбирали ділянки візуально незміненої тканини кори надниркових залоз людини (позапухлинна тканина), що межує з пухлиною. Перед початком досліджень було отримано дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики. Принципи проведення експериментів відповідали схваленим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин положенням, що використовуються для експериментальних і інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Досліди з вивчення впливу літію хлориду на стероїдогенез проводили на адренкортикальній тканині людини. Залозу після видалення перенесли на лід, очищали від сполучної, жирової та хромафінної тканин. Ретельно подрібнювали гострим лезом на зрізи товщиною приблизно 0,5 мм. Наважку тканини масою 20 мг поміщали в інкубаційне середовище, яке складалось із 500 мкл живильного середовища 199 (Державний завод медичних препаратів, Україна) і містило 10 ммоль/л HEPES (pH 7,4) (Calbiochem, США) та 0,2% бичачого сироваткового альбуміну (Serva, Німеччина). У дослідні проби перед початком інкубації вносили LiCl (ч.д.а., Мерск, Німеччина) у кінцевій

концентрації 5 ммоль/л і 10 ммоль/л. Проби інкубували на водяній бані впродовж 3 год за температури 37 °C і постійного струшування. Інкубацію припиняли, видаляючи зрізи із середовища. В інкубаційному середовищі визначали вміст 11-ОКС флуориметричним методом [13]. Як стандарт для визначення сумарних 11-ОКС використовували гідрокортизон (Koch-Light, Велика Британія). Концентрацію сумарних 11-ОКС виражали в мкг/мг тканини.

Вплив літію хлориду *in vitro* на рівень експресії ERK1/2 вивчали в тканині кори надниркових залоз морських свинок за допомогою вестерн-блот-аналізу. Досліди проводили на зрізах, які інкубували в 1 мл середовища. Склад середовища та тривалість інкубації описано вище. По завершенні інкубації зрізи тканини гомогенізували у 2 об'ємах охолодженого лізуючого буферу (Sigma, США). Гомогенат центрифугували за 24100 g впродовж 10 хв, надосадові фракції зберігали до використання за температури -60 °C. У супернатанті визначали білок за методом Бредфорд [14], електрофорез проводили за методом Леммлі [15].

У роботі використано моноклональні антитіла проти ERK1/2 (Cell Signaling Technology, США), β -актину (Sigma, США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США). Кількісний аналіз ERK1/2 здійснювали за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу (Gel Pro Analyzer v. 4.0). Нормалізацію оптичної щільності ERK1/2 здійснювали за вмістом β -актину. Отримані дані наведено в умовних одиницях оптичної густини.

Обробку отриманих даних проводили за загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Стьюдента та U-критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Дані експериментів наведено у вигляді $M \pm m$. Вірогідно значущою вважали різницю за $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

На **рис. 1** наведено дані про вплив різних концентрацій літію хлориду *in vitro* на секрецію 11-ОКС. Результати досліджень показали, що літій хлорид в концентрації 5 ммоль/л не впливав на інтенсивність синтезу кортикостероїдних гормонів у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини, хоча у концентрації 10 ммоль/л спостерігали вірогідне підвищення (на 38%) вмісту 11-ОКС у середовищі інкубації. Отже, отримані результати

Оригінальні дослідження

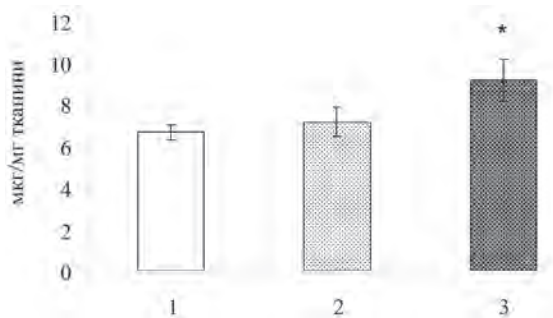


Рис. 1. Вплив літію хлориду *in vitro* на вміст 11-ОКС в інкубаційному середовищі у процесі інкубації зрізів тканини кори надниркових залоз (n=5): 1 — контроль; 2-5 ммоль/л літію хлориду; 3-10 ммоль/л літію хлориду; * — $p < 0,05$ — порівняно з контрольною пробою без хлориду літію (t-критерій Стьюдента).

свідчать про стимулюючий вплив літію хлориду на процеси стероїдогенезу *in vitro* у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини.

У літературі наводяться суперечливі дані про вплив літію хлориду на процеси стероїдогенезу. З одного боку, одноразова ін'єкція літію хлориду та тривале його введення викликали підвищення рівня кортикостерону у щурів [4]. З іншого боку, 10 ммоль/л хлориду літію пригнічували стимульований ангіотензином II біосинтез альдостерону [5]. Показано, що літій пригнічує стимульований калієм стероїдогенез [6]. Автори висловили припущення, що цей факт може бути пов'язаним із гальмуванням ресинтезу фосфоінозитидів та активності протеїнкінази С внаслідок інгібіції іоном інозитолфосфатази.

Водночас необхідно враховувати, що функції залози можуть регулюватися не лише змінами швидкості синтезу гормонів, але й шляхом зміни маси функціонуючої залози. У зв'язку з цим регуляція мітогенезу та апоптозу також може робити свій внесок до загальної функціональної відповіді надниркових залоз. У попередніх наших роботах було показано, що літію хлорид пригнічує інтенсивність фрагментації ДНК в умовно нормальній тканині та тканині пухлин кори надниркових залоз людини [16].

Аби оцінити можливу участь ERK1/2 в опосередкованні дії іонів літію на функцію та проліферацію клітин в адренкортикальній тканині, визначали рівень експресії її тотальних форм залежно від концентрації літію хлориду в інкубаційному середовищі. З рис. 2 видно, що рівень експресії ERK1/2 у тканині кори надниркових залоз морських свинок помітно зростає вже за наявності 5 ммоль/л літію хлориду, а підвищення концентрації до 10 ммоль/л

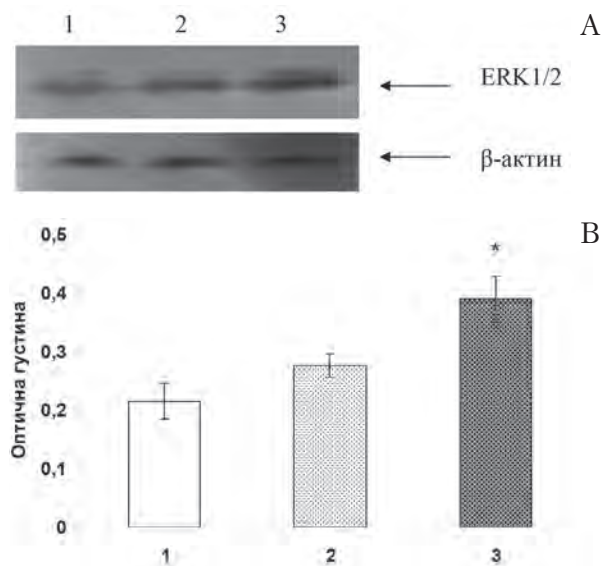


Рис. 2. Вплив хлориду літію *in vitro* на рівень експресії вільних форм ERK1/2 у тканині кори надниркових залоз (n=3): А — типові результати імуноблотингу одного досліді з 3; Б — усереднені дані; 1 — контроль; 2-5 ммоль/л хлориду літію; 3-10 ммоль/л хлориду літію; * — $p = 0,05$ — порівняно з контрольною пробою без хлориду літію (U-критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні).

призводить до збільшення її вмісту в 1,9 раза. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури про участь ERK1/2 у регуляції синтезу кортикостероїдних гормонів [17]. Отже, стимуляція синтезу стероїдних гормонів в адренкортикальній тканині літєм може відбуватися шляхом залучення вільних форм ERK1/2.

Наразі в літературі немає жодного повідомлення про вплив іонів літію на активність ERK1/2 у клітинах кори надниркових залоз. Зрозуміло, що ERK1/2 є не єдиною протеїнкіназою, що їх залучено до реалізації ефекту літію на процеси стероїдогенезу. Так, у попередніх дослідженнях нами було показано, що літію хлорид *in vitro* підвищує рівень експресії GSK-3 β у тканині кори надниркових залоз морських свинок [18]. Висловлено припущення про можливу роль цієї кінази у процесах регуляції стероїдогенезу.

Не виключено також участь деяких інших регуляторних шляхів, які опосередковують стероїдогенні ефекти літію хлориду в тканині кори надниркових залоз, зокрема ПКА- і ПКС-залежних механізмів.

Отже, вперше встановлено зміни вмісту ERK1/2 у тканині кори надниркових залоз під впливом літію хлориду. Збільшення синтезу 11-ОКС може пояснюватись участю ERK1/2 у регуляції стероїдогенезу в адренкортикальній тканині *in vitro*.

Список використаної літератури

1. Тронько М.Д., Микоша О.С., Ковзун О.І., Пушкар'єв В.М. Регулятори функції кори надниркових залоз. — К.: Доктор-Медіа, 2009. — 244 с. (Tronko M.D., Mikosha O.S., Kovzun O.I., Pushkarev V.M. Regulators of adrenocortical function. — K.: Doctor-Media, 2009. — 244 p.).
2. Петров Н.М., Семенов В.В. Литий в ліченні тиреотоксикоза // Пробл. ендокринології. — 1986. — Т. 32, № 2. — С. 83-86. (Petrov N.M., Semenov V.V. Lithium in the treatment of thyrotoxicosis // Probl. endocrinol. — 1986. — Vol. 32, № 2. — P. 83-86).
3. Prakash I., Nylen E.S., Sen S. Lithium as an alternative option in graves thyrotoxicosis // Case Rep. Endocrinol. — 2015. — Vol. 2015. — article ID869343. — P. 4. — doi.org/10.1155/2015/869343.
4. Jacobs J.J. Effect of lithium chloride on adrenocortical function in the rat // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. — 1978. — Vol. 157. — P. 163-167.
5. Balla T., Enyedi P., Hunyady L., Spat A. Effects of lithium on angiotensin-stimulated phosphatidylinositol turnover and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells: a possible causal relationship // FEBS Lett. — 1984. — Vol. 171. — P. 179-182.
6. Тронько М.Д., Ковзун О.І., Пушкар'єв В.М. Механізми регуляції стероїдогенезу в корі надниркових залоз. — К.: Центр навчальної літератури, 2006. — 304 с. (Tronko M.D., Kovzun O.I., Pushkarev V.M. The mechanisms of regulation of steroidogenesis in the adrenal cortex. — K.: Centr navchalnoi literatury, 2006. — 304 p.).
7. Ebstein R.P., Lerer B., Bennett E.R., Shapira B., Kindler S., Shemesh Z., Gerstenhaber N. Lithium modulation of second messenger signal amplification in man: inhibition of phosphatidylinositol-specific phospholipase C and adenylate cyclase activity // Psychiatry Res. — 1988. — Vol. 24, № 1. — P. 45-52.
8. Chen G., Masana M.I., Manji H.K. Lithium regulates PKC-mediated intracellular cross-talk and gene expression in the CNS in vivo // Bipolar Disord. — 2000. — Vol. 2. — P. 217-236.
9. Alda M., Shao L., Wang J.F., Lopez de Lara C., Jaitovich-Groisman I., Lebel V., Sun X., Duffy A., Grof P., Rouleau G.A., Turecki G., Young L.T. Alterations in phosphorylated cAMP response element-binding protein (pCREB) signaling: an endophenotype of lithium-responsive bipolar disorder? // Bipolar Disord. — 2013. — Vol. 15, № 8. — P. 824-831.
10. Tsuchiya Y., Saji M., Isozaki O., Arai M., Tsushima T., Shizume K. Effect of lithium on deoxyribonucleic acid synthesis and iodide uptake in porcine thyroid cells in culture // Endocrinology. — 1990. — Vol. 126, № 1. — P. 460-465.
11. Harvey B.H., Carstens M.E., Taljaard J.J.F. Antagonism of a novel cholinotropic property of lithium by scopolamine: a cyclic GMP hypothesis // South Afric. J. Sci. — 1990. — Vol. 86. — P. 265-269.
12. Nadeem R.I., Ahmed H.I., El-Denshary E.E. Effect of imipramine, paroxetine, and lithium carbonate on neurobehavioral changes of streptozotocin in rats: impact on glycogen synthase kinase-3 and blood glucose level // Neurochem Res. — 2015. — Vol. 40, № 9. — P. 1810-1818.
13. Балашов Ю.Г. Флюориметрический метод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. — 1990. — Т. 76, № 2. — С. 280-283. (Balashov Yu.G. Fluorometric micromethod of corticosteroids determination: comparison with other methods // Fisiol. Zhurn. SSSR. — 1990. — Vol. 76, № 2. — P. 280-283).
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248-254.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.
16. Pushkarev V.M., Tronko N.D., Kostyuchenko N.N., Mikosha A.S. Effect of o, p'-DDD and Li⁺ on apoptotic DNA fragmentation in conventionally normal and tumour tissues of human adrenal cortex // Ukr. Biochem. J. — 2007. — Vol. 79, № 2. — P. 44-49.
17. Vargyas V.E., Kaushal K.M., Monau T.R., Myers D.A., Ducsay C.A. Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) signaling pathway plays a role in cortisol secretion in the long-term hypoxic ovine fetal adrenal near term // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. — 2013. — Vol. 304. — R636-R643.
18. Ковзун О.І., Левчук Н.І., Пушкар'єв В.М., Пушкар'єв В.В., Тронько М.Д. Вплив іонів калію та літію на рівень експресії кінрази глікогенсинтази в адренкортикоцитах морських свинок // Ендокринологія. — 2013. — Т. 18, № 4. — С. 11-15. (Kovzun O.I., Levchuk N.I., Pushkarev V.M., Pushkarev V.V., Tronko M.D. Effect of potassium ions on the level of expression of glycogen synthase kinase in guinea pig adrenocorticocytes // Endokrynologia. — 2013. — Vol. 18, № 4. — P. 11-15).

(Надійшла до редакції 06.05.2016 р.)

Влияние ионов лития на стероидогенез и уровень экспрессии протеинкиназы ERK в ткани коры надпочечников

Н.И. Левчук, О.С. Лукашеня, Е.И. Ковзун, А.С. Микоша

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Известно, что препараты лития используют при лечении психических расстройств. Однако эффекты иона, которые связаны с процессами синтеза стероидных гормонов в коре надпочечников, изучены недостаточно. **Цель.** Исследовать влияние разных концентраций лития хлорида *in vitro* на содержание 11-гидроксикортикостероидов (11-ОКС) и уровень экспрессии тотальных форм ERK1/2 в ткани надпочечников. **Материалы и методы.** В опытах *in vitro* использована послеоперационная адренкортикальная ткань и ткань надпочечников морских свинок. Количественное определение уровня 11-ОКС проводили флуориметрическим микрометодом. Уровень экспрессии ERK1/2 изучали с помощью вестерн-блот-анализа. **Результаты.** Показано, что инкубация срезов внеопухолевого ткани надпочечников человека с лития хлоридом приводит к повышению уровня 11-ОКС в питательной среде и уровня экспрессии ERK1/2 в ткани надпочечников морских свинок. **Вывод.** Стимуляция синтеза кортикостероидов под действием лития хлорида в адренкортикальной ткани *in vitro* может быть опосредована ERK1/2.

Ключевые слова: лития хлорид, 11-ОКС, ERK1/2, ткань коры надпочечников.

Effect of lithium ions on steroidogenesis and ERK protein kinase expression level in tissue of the adrenal cortex

N.I. Levchuk, O.S. Lukashenia, O.I. Kovzun, O.S. Mikosha

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. of Med. Sci. of Ukraine»

Summary. It is known that lithium preparations are used in the treatment of mental disorders. However, the ion effects that are associated with the processes of synthesis of steroid hormones in the adrenal cortex are not studied enough. **Aim.** To study the effect of different concentrations of lithium chloride on the content of 11-Hydroxycorticosteroids (11-OHCS), and ERK1/2 expression level of total form in tissue of the adrenal glands *in vitro*. **Materials and methods.** Postoperative adrenocortical tissue and tissue of the adrenal glands of guinea pigs were used in experiments *in vitro*. The quantitative determination of 11-OHCS level was conducted by fluorometric micromethod. The ERK1/2 expression level was studied by Western blot analysis. **Results.** It was shown that incubation of extratumoral tissue sections of human adrenal glands with lithium chloride leads to the increased level of 11-OHCS in the culture medium and ERK1/2 expression level in tissue of the guinea pig adrenal glands. **Conclusion.** Stimulation of the corticosteroid synthesis under lithium chloride effect in adrenocortical tissue can be mediated by ERK1/2 *in vitro*.

Keywords: lithium chloride, 11-OHCS, ERK1/2, tissue of the adrenal cortex.